

HPLC에 의한 製劑中の Capsaicin 分離定量

毒性藥品科

申 守 容 · 金 明 姬

Determination of Capsaicin in Mixture Formulars by HPLC

Toxicopharmaceutical Division

Soo Yong Shin and Myunghee Kim

==Abstract==

This study was performed to investigate the separation and quantitative determination of capsaicin in mixture formulars. Capsaicin contents were examined for three commercial batches—one, oral liquid preparation and two pastes collected from domestic companies.

Capsaicin was separated by μ -Bondapak phenyl column using high performance liquid chromatograph with methanol/water (65 : 35) as the mobile phase.

The results were as follows.

1. Contents of capsaicin in pastes were 94.3%, and 129.8%. Those data were satisfied the limit of the company's assay requirement, 90~180%.
2. Capsaicin content in Oral liquid preparation was showed about 200 times of labelled amount.
3. Detection limit of capsaicin was 0.5 μ g and retention time was about 13 minutes.

This method could be applied to the quality control of capsaicin preparations.

緒 論

가지과에 속하는 蕃椒(*capsicum annum L.*)는 강력한 매운맛 이외에 일종의 풍미를 갖고 있어 옛부터 조미용 및 향신료로 많이 사용되어 왔으며 한방에서는腰痛, 神神經痛 등에 外用劑로 또는 辛味性 健胃약에 이용되고 있다. 그리고 우리나라 고유의 食品中에서 김치와 고추장에는 多量 사용되어지고 있다. 蕃椒의 辛味成分은 capsaicin이라는 phenol性 物質로서 Nelson에 의해¹⁾ 처음으로 분리되고 Crombie의 capsaicin 합성을 통해 그 구조가 확정되었다.²⁾ 최근 Bennet와 Kirby에 의해 蕃椒의 辛味成分은 capsaicin(69%), dihydrocapsaicin (22%), nordihydrocapsaicin (7%), homocapsaicin(1%), homodihydrocapsaicin(1%)의 조성으로 이루어진 것임이 mass-spectrometry에 의해 밝혀진 바 있으나³⁾ 이 capsaicin 同族體의 구성비와

함량은 品種과 산지에 따라 다르며 國內 産品중의 capsaicin類 含量도 0.1% 内外로 일본이나 구미산에 비하여 적은 편이며 同族體間의 비율에도 차이가 많다.²⁻⁵⁾ 예전에는 蕃椒中の 辛味成分의 定量은 總 capsaicoids를 측정 하였으나, 生藥의 品質관리를 위하여 含有하는 數種의 化合物에 대한 各 成分分析이 이루어지고 있는바 最近 GLC,⁶⁻¹¹⁾ GC-MS,¹²⁻¹⁴⁾ HPLC¹⁵⁻²¹⁾ 등에 의해 capsaicin 同族體間의 同時分別定量에 관한 많은 報告가 있다. 그러나 capsaicin을 含有하는 製劑中の capsaicin을 定量하여 그 製劑의 品質을 평가하게 되어있는 生藥製劑의 경우 公定서나 자가기준에 기술된 分析方法으로는 辛味성 있는 자료를 얻을 수가 없었던 바 이에 저자 등은 HPLC를 이용하여 國內에서 生産되어지는 고추가루 또는 고추톱크를 含有하는 製劑로 내복액제 1종과 파스타제 2종에 대하여 capsaicin을 지표물질로 定量한 결과 知見을 얻어기에 報告한다.

材料 및 方法

1. 器機 및 試藥

1) 器機

① High performance liquid chromatography; (Waters associates Inc.) Solvent Delivery System, U 6K Injector(Model 510) Variable-wavelength detector (Model 481) electronic Integrator(Model 745)

② Vacuum evaporator(Büchi rotavapor 110)

2) 시약

① Capsaicin(Sigma chemical company 98%)

② Dihydrocapsaicin (Sigma chemical company

90%)

③ Methyl alcohol(Merck, HPLC/用 James Burrough(F.A.D) Ltd, G.R.)

④ Distilled water(L.C.用)

⑤ Acetone(Tedia Company INC. HPLC用)

2. 시 료

辛味性건위제인 내복액제 1종은 100ml中 capsaicin으로 0.006mg을 함유하는 것을 사용하였으며, SA₁이라 명명 하였고, 파스타제 2종은 각시료 1매中 capsaicin으로 1.4mg을 함유 하는 것과 1매中 capsaicin으로 0.9072mg 함유한 것을 사용하였다. 전자를 SB₁라 명명하고, 후자를 SB₂라 명명하였다. 이 3개사의 시료의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Components of samples in prescription

Drug form	Oral liquid preparation	Pastes	Pastes
Sample	SA ₁ (in 100ml)	SBI(in 18g)	SB ₂ (in 1g)
Rx.	Cinnamomum Cassia 80mg Umsaria Gambir 30m Elettaria Cardamomum 60mg Capsicum annum 3mg	Methyl salicylate 180mg dl-camphor 90mg Capsicum extract 28mg	Methyl salicylate 30mg Capsicum powder 100mg Capsicum tincture 10mg
Total capsaicin	0.006mg	1.4mg	0.504mg

3. 실험 방법

1) 試料液의 調製

① 시료 SA₁은 액제이므로 capsaicin으로 0.012mg 해당량을 vacuum evaporator로 감압 농축하여 methanol 5.0ml로 녹여 무수망초로 여과한 액이 20ml되도록 메스플라스크 표선까지 methanol로 맞춘다. 이액 5.0ml를 취하여 10ml메스플라스크에 넣은 후 methanol로 표선까지 채워 섞고 millipore sample clarification kit(Millex®-HV, 0.45µm filter unit)로 여과후 시료 SA₁으로 하였다.

② 시료 SB₁과 SB₂를 각각 10매씩 취하여 중량편차 후 각 2매를 취하여 잘게 가위로 자른후 지지체를 박리하여 미리 Acetone: MeOH(7:3)200ml를 담아놓은 환저플라스크에 넣고 80°C 수욕상에서 5hrs 환류냉각기를 장치하여 추출후 이액을 여과하여 vacuum evaporator로 감압농축후 methanol 5.0ml로 녹여 무수망초로 여과한 액이 20ml 되도록 메스플라스크 표선을 methanol로 맞춘다. 이액 5.0ml를 취하여 10ml 메스플라스크에 넣은 후 methanol로 표선을 채워 섞고 millipore여과 kit로 여과하여 시료 SB₁과 SB₂로 하였다.

2) 표준액의 調製

① Capsaicin 표준품 10.0mg을 정밀하게 취하여

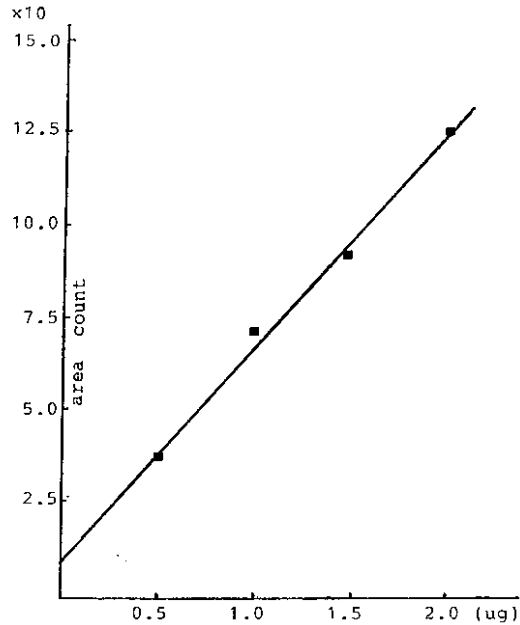


Fig. 1. Calibration curve of Capsaicin standard

methanol에 녹여 20ml로 한후 이액 2.0ml를 취하여 10ml 메스플라스크에 넣은 후 methanol로 표선까지 채워 섞어 표준액으로 하였다.

② 검량선 作成 : Capsaicin 0.1mg/ml 표준용액을 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 주입하여 얻어진 area count로 검량선을 作成하였다.

3) 定量

상기의 방법에 의해 調製된 표준액 및 시료를 Table I의 HPLC 분석조건에 따라 각각의 試料中에 含有된 capsaicin의 量을 定量 하였다.

結果 및 考察

Capsaicin 0.1mg/ml 표준용액을 5 μ l, 10 μ l 15 μ l 20 μ l

주입하여 얻은 檢量線은 Fig. 1과 같이 양호한 직선성을 보였다. 試料의 추출용매로 100% methanol이나 acetone을 사용할 경우에는 色素 추출이 많이되어 capsaicin의 검출 및 分離를 용이하게 할 수 없었다. 가장 좋은 추출용매는 Acetone: MeOH(7:3)의 비율로 지표成分의 검출을 용이하게 하였다. Patrick¹⁷⁾ 등이 heat level에 따른 蕃椒中 辛味成分의 추출시 ethanol 100%을 추출용매로 하여 5시간 이상에서는 동일한 결과를 보였으나, 상기 試料의 경우에 있어서는 추출용매로 Acetone: MeOH(7:3)에서 5시간 환류추출이 양호한 결과를 가져왔다. Stichee¹⁵⁾ 등의 H.P.L.C를 이용한 蕃椒中 辛味成分의 同族體의 分離 定量 결과를 참고로 동일한 H.P.L.C조건에서 상기 試料의 分離 定량을 시도 하였으나 좋은 결과를 얻지 못하였

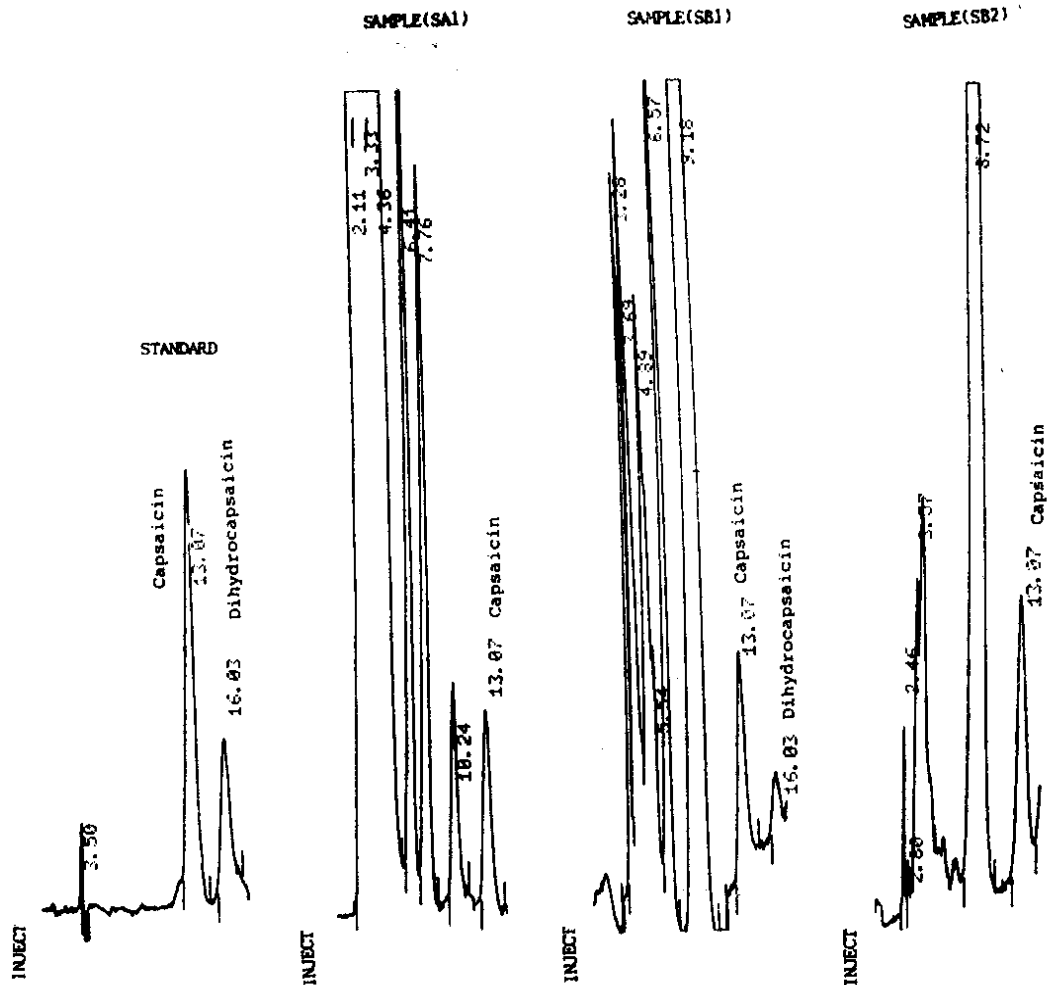


Fig. 2. HPLC Chromatogram of standard and samples

Table 2. Conditions of HPLC for analysis of Capsaicin

Model	: Waters with 481 variable detector U6K injector and integrator
Column	: μ -Bondapak-phenyl (300×3.9 mm I.D.)
Detector	: UV 280 nm
Mobile phase	: MeOH/H ₂ O (65 : 35)
Flow rate	: 0.8 ml/min.
Chart speed	: 0.25 cm/min.
Column temp	: Room temperature
Inj. volume	: 20 μ l

Table 3. Contents of Capsaicin in samples

No. of test	SA1	SB1	SB2
1	20686.7	93.6	129.0
2	20962.2	94.5	133.3
3	20804.4	94.6	128.8
4	20772.2	94.5	127.6
5	20804.6	94.6	130.1
\bar{X}	20806.0	94.4	129.8
\pm S.E	\pm 99.7	\pm 0.4	\pm 2.1

다. μ -Bondapak C₁₈ column이 상기 試料에서는 적합치 않았으며, 또한 Jurenitsch²¹⁾ 등의 실험 결과를 참고로 μ -porasil column을 사용하여 상기 試料를 갖지고 總 capsainoids의 定量을 시도 하였으나 이것 역시 좋은 결과를 얻을 수 없었다. 이같은 결과는 生藥이 갖는 특징으로 그 자체가 원천적 混合物의 형태이며, 단미(simple herb)때와 다미(복방처방 : polyprescription) 때와는 또 다른 조건을 수반하기 때문이라 사료된다. 상기 試料인 내복약제 1종과 파스타제 2종에서 상기 H.P.L.C.조건인 μ -Bondapak phenyl column을 사용한 결과 Fig. 2와 같은 chromatogram을 얻을 수 있었다. 이동상은 methanol과 water의 gradient elution을 한 결과 methanol: water(65 : 35)에서 分離能이 가장 양호 하였다. methanol의 비율이 늘어나면 peak가 sharp 해지나 分離가 좋지 않았으며, water의 비율이 늘어나면 peak 分離는 좋으나 peak 모양이 broad 하였다. Capsaicin peak retention time은 13분으로 재현성 있는 결과를 보였다.

蕃椒의 辛味成分中 同族體中の 두번째로 多量含有되어 있는 dihydrocapsaicin도 상기 H.P.L.C. 조건으로

표준용액 및 시료 SB₁에서 용이하게 分離되었다. 시료 SA₁ 및 SB₂에서 인지 되지 않은 것은 Kim⁴⁾ 등이 실험 결과에 의하면 國內 재배品種의 capsaicin의 含量이 비교적 적고 同族體間的 비율의 차이가 있기 때문이라 생각되어진다. 以上の 實驗條件에 따라 試料를 分析한 結果가 Table 3에 提示되었다. 試料 SA₁은 표기량에 비하여 약 200배 이상의 capsaicin을 함유한 것은 試料 SA₁이 다미 제제로서 蕃椒 以外の 기타 成分에 영향을 받았는지 혹은 製劑時 고추 tincture 등을 과량 넣은 것인지 여부는 本 實驗으로는 알 수가 없었다. 試料 SB₁, SB₂의 경우는 단미 제제로서 capsaicin 含量이 表記量의 94.4%, 129.8%로 나타났으며 이는 자가기준 90°~180°에 준할 경우 基準에 적합하였다.

結 論

본 定量法은 복합製劑中 capsaicin을 H.P.L.C.를 利用하여 methanol: water(65 : 35) 용매로 간편하게 定量할 수 있었다. Detection. limit는 0.5 μ g까지 定量이 가능하였고, 재현성이 양호하였으며 약 80%의 회수율은 보였다. capsaicin의 定量法으로 蕃椒를 含有하는 단미(simple herb) 및 다미(복방처방 : polyprescription) 製劑에 있어서 利用될 수 있으리라 사료된다.

參 考 文 獻

1. Nelson, E.K. and Dowson, L.F.: The constitution of capsaicin, The pungent principle of capsicum. *J. Am. Chem. Soc.* 45:2179 (1923).
2. Crombie, L., Dandegaonker, S.H. and Simpson, K.B.: Synthesis of capsaicin. *Amides of Vegetable Origin.* VI. 1025 (1955).
3. Bennett, D.J. and Kirby, G.W.: Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc. Co.)* 442 (1968).
4. Kim, K.H. and Lee, S.S.: Constituents of capsaicin from Korean hot pepper. *Seoul. Univ. J. of pharm. Sci.* 2:171 (1977).
5. Leete, E. and Loudon, M.C.L.: Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum frutescens. *J. Am. Chem. Soc.* 90:6837 (1968).
6. Sagara, K., Kakizawa, S., Kasuya, K., Misaki, T. and Yoshizawa H.: Simultaneous determination of capsaicin, dihydrocapsaicin and nord-

- ihydrocapsaicin in capsicum Fruit by gas chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 28(9): 2796 (1980).
7. Müller-Stock, F.A., Joshi, R.K. and Büchi, J.: I. Study of the components of capsaicin. quantitative gas chromatographic determination of individual homologs and analogs of capsaicin in mixtures, from a natural source and of vanillyl pelargonic amide as adulteration. *J. Chromatogr.* 63:281, (1971).
 8. Jurenitsch, J., and Leinmüller, R.: Quantification of nonylic acid vanillylamide and other capsaicinoids in the pungent principle of capsicum fruits and preparations by gas-liquid chromatography on glass capillary columns. *J. Chromatogr.* 189:389 (1980).
 9. Todd JR, P.H., Bensinger, M.G. and Biftu, T.: Determination of pungency due to capsicum by gas-liquid chromatography. *J. of Food Science* 42(3):660 (1977).
 10. Krajewska, A.M. and Powers, J.J.: Gas chromatographic determination of capsaicinoids in green capsicum fruits. *J. of A. O. A. C.* 70(5) 926 (1987).
 11. Krajewska, A.M. and Powers, J.J.: Gas chromatography of methyl derivatives of naturally occurring capsaicinoids. *J. Chromatogr.* 409:223, (1987).
 12. Lee, K.R., Suzuki, T., Kobayashi, M., Hasegawa, K. and Iwai, K.: Quantitative microanalysis of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin using mass fragmentography. *J. Chromatogr.* 123:119, (1976).
 13. Masada, Y., Hashimoto, K., Inoue, T. and Suzuki, M.: Analysis of the pungent principles of capsicum annum by combined gas chromatography-mass spectrometry, *J. Food. Science.* 36:858 (1971).
 14. Iwai, K., Suzuki, J., Fujiwake, H. and Oka, S.: Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 172:303 (1979).
 15. Sticher, O., Soldati, F. and Joshi, R.K.: High performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and fructus capsici, *J. Chromatogr.* 166: 221, (1978).
 16. Jurenitschi, J. and Kampelmüller, I.: Rapid determination of nonylic acid vanillylamide and other capsaicinoids in capsicum fruits and extracts by means of Ag⁺-complexation high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 193:101, (1980).
 17. Hoffman, P.G., Lego, M.C. and Galetto, W.G.: Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 31:1326, (1983).
 18. Attuguayefio, V.K., Buckle, K.A.: Rapid sample preparation method for HPLC analysis of capsaicinoids in capsicum fruits and oleoresins. *J. Agric. Food. Chem.* 35:777, (1987).
 19. Chiang, G.H.: HPLC analysis of capsaicins and simultaneous determination of capsaicins and piperine by HPLC-EC Dand U.V. *J. Food Science* 51:499, (1986).
 20. Kawada, T., Watanabe, T., Kat. Ura, K., Takami, H. and Iwai, K.: Formation and metabolism of pungent principle of capsicum fruits. *J. Chromatogr.* 329:99, (1985).
 21. Jurenitsch, J., Bingler, E., Becker, H. and Kubelka, W.: Simple HPLC-Method for determination on total and single capsaicinoids in capsicum-fruits. *J. Medicinal Plant Research* 36:54, (1979).